

Méthodes biochimiques :

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Définition :

C'est une méthode de dosage de différentes molécules (parfois atome après complexation) en solution par mesure de l'absorption d'un rayonnement lumineux monochromatique (UV visible) par ces molécules.

Cette méthode permet en biochimie clinique de doser de nombreux paramètres essentiellement sérique ou plasmique (sérum ou plasma) les principaux sont le glucose, urée, créatinine et calcium, phosphore, bilirubine conjuguée et non conjuguée, hémoglobine, albumine.

Les activités enzymatiques :

Transaminase (ALAT et ASAT) amylase phosphatase alcaline, LDH (lactico déshydrogénase) CPK (créatinine phosphokinase)

La spectrophotométrie d'absorption moléculaire est l'appareil de base du laboratoire de biochimie clinique.

Les principes de l'absorption moléculaire :

A-phénomène physique :

Dans une molécule les électrons sont placés dans une orbitale autour des atomes représentant chacun un niveau d'énergie qui est d'autant plus élevé quand les électrons sont plus proche du noyau.

Le passage d'un électron d'une orbitale centrale à une périphérique nécessitera un apport de quantité d'énergie = à la différence entre les deux orbitales, cette énergie pourra être apportée par des photons de longueur d'onde déterminée : $E = h \cdot c / \lambda$

h : constante de Planck.

c : vitesse de lumière.

λ : longueur d'onde.

Il y a alors absorption de photon par des molécules c'est le phénomène d'absorption moléculaire utilisé en spectrophotométrie pour une substance en solution, l'étude de l'absorption pour les différentes longueurs d'ondes fournit le spectre de cette substance, l'absorption est en fait variable elle sera maximum pour une certaine longueur d'onde, ce spectre est caractéristique de la nature chimique des substances.

Cette absorption sera d'autant plus importante dans le visible ou UV que le nombre de double liaison conjuguée sera plus grand.

Très peu de molécule absorbe directement dans le visible ou le proche UV.

Pour utiliser la SPM il sera alors nécessaire de réaliser une R(x) chimique qui permettra d'obtenir un témoin spécifique de la substance.

Cette augmentation du témoin spécifique qui permettra de connaître la concentration d'une molécule ou de l'activité d'une enzyme.

B- la loi de Beer Lambert :

Pour qualifier l'absorption d'un faisceau monochromatique deux paramètres ont été déterminés :

La transmission $T = i / i_0$

i_0 : Intensité initiale de faisceau

i : intensité résultante après traversée de substance en solution.

La densité optique $D_0 = -\log i / i_0 = -\log T$

L'absorption dépend aussi de la concentration pour des solutions diluées, la loi de Beer Lambert indique que $i = i_0 e^{-Lc}$

L = longueur du trajet optique à travers la solution.

C : concentration de la substance dans la solution.

La loi de Beer Lambert = $D_0 = L \cdot C$

Or dans des conditions déterminées la densité optique est proportionnelle à la concentration de substance que l'on veut doser.

Si la moitié est transparente $T = 100\% \rightarrow D_0 = 0$

Si la moitié est opaque $T = 0 \rightarrow D_0 = \infty$

La loi de BR est valable dans des conditions très précises :

La solution doit être homogène dans les solutions hétérogènes, il existe des phénomènes de diffusion qui entraînent une baisse accélérée de l'intensité résultante

La solution doit être diluée si la concentration est très importante, la relation $D_0 = f(c)$ n'est plus linéaire, il faut un monochromatisme très poussé pour éviter des interférences de certaines substances, enfin pour deux substances en solution absorbant les photons à la même longueur d'onde, la D_0 sera égale à la somme des D_0 de chacune des substances il y a une additivité de $D_0(S_1 + S_2) = D_0(S_1) + D_0(S_2)$

Appareillage

Les appareils utilisés sont les SPM, si toutes les longueurs d'onde sont utilisables ou des photométries si seulement certaines longueurs d'onde le sont ils sont constitués :

Une source lumineuse, une fente d'entrée, un élément monochromatique de la cuve de trajet optique, des cellules (monochromes) photoélectriques d'un amplificateur un enregistreur.

La lampe doit constituer un faisceau lumineux d'intensité constante et doit être stable.

La sélection de la longueur d'onde se fait par des filtres soit des monochromateurs, il existe deux type de filtres :

Filtre coloré :

Ne permettant qu'une sélection approximative de la longueur d'onde.

Filtre interférentiel :

Permettant de meilleures sélections

Il existe deux types de monochromateur :

Les prismes et les réseaux ces derniers sont les performantes, ces deux systèmes permettent par opposition en filtre de sélectionner une gamme continue de longueur d'onde, celle utilisée en biochimie va environ entre 340 à 650nm

Le faisceau monochromatique ainsi fourni traverse la cuve contenant la solution.

La densité optique étant en fonction du trajet optique c'est-à-dire de la longueur de la cuve, il est nécessaire d'utiliser des cuves de longueur de constance et standardiser, les cuves les plus utilisées ont la largeur d'un cm d'un côté, elle sont en plastique à usage unique soit en verre, un certain nombre de précaution est nécessaire dans l'utilisation de ces cuves, elles pressentent généralement deux faces collées ce qui implique de faire attention au positionnement au cuve dans l'appareil .

Lors du remplissage de la cuve il est nécessaire de ne pas effectuer avec pipette des rayures sur les parois de la cuve ce qui entraîne une diffusion du faisceau monochromatique

il est nécessaire de ne pas laisser les bulles d'air qui raccourcissent le trajet optique, en fin au cours du nettoyage il faut faire attention au dépôt sur les parois qui entraîneront une absorption supplémentaire ou perturbation de la réaction, certain dosage se font en cinétique, dans ce cas durant le déroulement de la réaction dépendant de la température il sera nécessaire de thermostatier la cuve, en fin il existe deux grand système de lecture le galvanomètre et l'affichage digital

Dosage par SPM d'absorption moléculaire :

Le dosage de substrat par SPM moléculaire est souvent indirecte par l'intermédiaire d'une réaction chimique ou biochimique, il se forme un produit spécifique (ou dérivé) de l'élément à doser, il existe actuellement de très nombreuses réactions qui sont préparées spécialement pour un dosage déterminé « KITS » c'est ce produit spécifique qui est dosé.

Il permet un emploi extrêmement simple, en photométrie on distingue deux grand type de réactions chimiques et donc deux méthodes :

Le dosage par colorimétrie directe

Le dosage par voie enzymatique.

1-Le dosage par colorimétrie directe :

En colorimétrie directe le principe substrat+ réactif => complexe coloré.

Le substrat réagit avec le réactif pour former un complexe coloré, ce complexe a une longueur d'onde déterminée (correspond à celle de la couleur complémentaire) Ex : lumière verte pour un complexe coloré, rouge qui possède un coefficient d'extinction importante, c'est-à-dire qu'il absorbe la lumière, c'est cette longueur d'onde qui sera sélectionnée pour mesurer l'absorption du complexe coloré, en spm d'absorption molaire.

Il faut noter que parfois il est utile de chauffer pour réaliser la réaction

Ex : le dosage des protéines sériques s'effectue à l'aide de la réaction de biuret, les ions cuivriques Cu^{++} du biuret réagissent avec les protéines sériques pour former un complexe coloré bleu qui absorbe à 545nm, dans cette méthode de colorimétrie directe la réaction est totale, cela veut dire que la concentration finale en complexe = concentration initiale en substrat à un facteur de dilution prêt.

Donc en connaissant la densité optique sur solution du complexe coloré il est possible de déterminer facilement la concentration de substrat d'après la loi de BEER Lambert $D_0 = L \cdot C$

L : longueur du trajet optique néanmoins plusieurs inconnus demeurent :

- Le coefficient d'extinction dépend du pH et de la température.
 - Dans les réactifs certains éléments peuvent avoir une absorption propre afin d'éliminer tous les facteurs d'erreur, il est nécessaire de travailler par méthode comparative, il est donc nécessaire de réaliser des témoins
- ➔ Un blanc destiné à éliminer l'interférence.

Blanc = réactif+ H_2O il permet de déterminer la D_{0bl}

- ➔ Un standard destiné à connaître la D_0 de la concentration connue Ex : $D_0 \text{ st } (D_{0CT})$
 $D_{0st} = D_{0reactif} + D_{0 \text{ standard}}$.
- ➔ Un échantillon = réactif + sérum ou plasma

Il permet de déterminer la D_0 de l'échantillon ou D_{0ec}

La concentration du paramètre dans le sérum peut être calculée par la formule suivante

$$C_{ech} = (D_{0ec} - D_{0bl} / D_{0st} - D_{0bl}) \cdot C_{st}$$

Pour certifier les calculs, il est possible de régler pour le tube blanc de la

$$[C_{ech}] = D_{ech} / D_{0st} \cdot [C]_{st}$$

Certaines spm permettent d'enregistrer automatiquement pour la D_{0st} , la $[C]_{st}$ dans ce cas la D_{0ech} correspond directement à la C_{ech}

L'inconvénient de la colorimétrie :

Est souvent un manque de spécificité d'autres éléments présent dans le sérum peuvent réagir avec le réactif pour former ainsi le composé coloré qui intervient à la même longueur d'onde, ainsi par exemple l'hortaluisine réagit non seulement avec le glucose ainsi que tous les aldoses qui sont généralement en concentration beaucoup plus faible que le glucose dans le sérum, dont l'utilisation de cette méthode de dosage fournit une concentration légèrement supérieure à la concentration de glucose dans le sérum.

2- dosage par voie enzymatique :

Substrat+réactif → produit → complexe coloré

La réaction chimique se fait à l'aide d'une enzyme biologique, le produit peut être dosé soit directement, soit transformé par un second réactif en un complexe coloré qui absorbera à une longueur d'onde déterminée ex : dosage du glucose

Glucose acide gluconique + H₂O₂

H₂O₂ + phénol + amino-4-antirine → chromogène

Ce chromogène absorbe l'énergie entre 492 et 556 nm

Un certain délai est nécessaire pour que la réaction soit complète, une fois la réaction terminée il est possible de déterminer la concentration du substrat par colorimétrie grâce à un étalon, cette méthode est plus spécifique que la colorimétrie directe, mais les réactions sont plus onéreuses.

STAFF

Conception : ManOfAction

D'après le cours de : M. Meharzi

Disponible sur : <http://veto-constantine.com>

Diffusé par : Taxi Phone Brahim

Remerciements : Napster94
